

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0039734 (43) 공개일자 2016년04월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 19/02 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0132401 (22) 출원일자 2014년10월01일 심사청구일자 2014년10월01일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 김경현 서울특별시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호 (서초4동, 삼풍아파트) 최인걸 서울 동작구 남부순환로263길 34, 501호 (사당동, 태영아트빌) (74) 대리인 특허법인다나

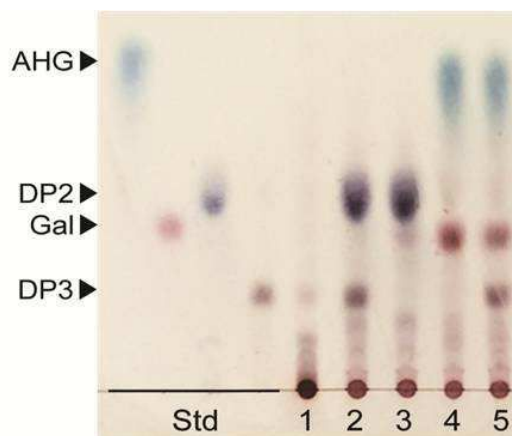
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **완충용액 전처리를 이용하여 한천에서 단당류의 생산 수율을 개선하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 완충용액 전처리를 이용하여 한천에서 단당류의 생산 수율을 개선하는 방법에 관한 것으로, 초기 기질로 아가로스 대신에 한천을 사용하고, 전처리 용매로 완충용액을 사용하며, 효소적 가수분해에 사용되는 효소로 아가레이즈, 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 적용하여 단당류인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 효과적으로 개선하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이찬형

서울 성북구 인촌로 22-3, 207호 (안암동2가)

윤은주

서울 금천구 시흥대로 53, 14동 104호 (시흥동, 현대빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345160488

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌프론티어

연구과제명 화학 및 단백질촉매 융합시스템을 통한 생물친화형 목질계 바이오매스 탈구조화 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.22 ~ 2011.08.21

명세서

청구범위

청구항 1

pH 6 - 9의 완충용액으로 한천을 전처리하는 단계; 및

상기의 전처리물에 대해 아가레이즈, 아가로라이틱 베타-갈락토시테이즈(agarolytic β -galactosidase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 가수분해 반응시키는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

완충용액은 Tris-HCl, 소듐 아세테이트(sodium acetate), 소듐 시트레이트(sodium citrate), 소듐 포스페이트(sodium phosphate) 및 glycine-NaOH으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

전처리 시 완충용액 내 한천의 농도는 0.1 - 5%이 되도록 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

전처리 조건은 100 - 200℃의 온도에서 1분 - 1시간 동안 수행하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

가수분해 반응 전에 전처리물에 대해 중화과정을 추가로 수행하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

아가레이즈는 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

아가로라이틱 베타-갈락토시테이즈(agarolytic β -galactosidase)는 SEQ ID NO: 3에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 SEQ ID NO: 5에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

가수분해 반응은 20 - 40℃의 온도 범위에서 0 - 200 rpm 조건으로 30분 - 7일 동안 실시하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 한천에서 당당류를 효소적으로 생산하기 위한 전처리 용매로 완충용액을 사용하여 당당류인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 해조류는 현재 많은 분야에서 사용되고 있는 목질계, 초본계 바이오매스에 비해 리그닌 등의 난활용성 성분의 함량이 적어 훨씬 수월하게 바이오에너지 및 바이오케미컬을 생산하기 위한 원료물질인 당당으로 전환될 수 있는 장점이 있다. 또한 식량자원을 이용하지 않기 때문에 식량자원의 에너지화에 따른 문제로부터도 자유롭다. 이러한 이유로 해조류는 대체 에너지를 비롯한 바이오케미컬 생산에 있어서 중요한 바이오매스로 각광받고 있다 (Wi et al., *Bioresour Technol*, 100 (2009), pp. 6658-6660).

[0003] 특히 홍조류(예, *Gelidium amansii*)는 이러한 바이오에너지 및 바이오케미컬 생산의 원료뿐 아니라, 그 구성성분인 아가로올리고당이 항산화, 항염증, 항암, 항알러지, 미백, 보습 등의 생리학적 활성이 우수한 것으로 보고되고 있어 의약 및 미용분야에 있어서도 그 활용도가 높다(Tomono et al. 미국 특허 제76622291호(2009), Enoki et al. 미국 특허 제691143282호(2005), Chen et al. *Food Technol Biotechnol*. 43(1) pp.29-36(2005), Chen et al. *Nut J*. 5(31) pp.1-12(2006)). 홍조류의 경우 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스가 알파-1,3 결합에 의해 결합되어있는 네오아가로바이오스를 그 기본단위로 하여 네오아가로바이오스가 베타-1,4 결합으로 서로 연결되어 있는 중합체인 아가로를 그 주요한 구성성분으로 한다.

[0004] 본 발명자들은 네오아가로바이오스를 포함한 아가로올리고당의 생리학적 기능성이 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에서 기인한다는 사실을 실험적으로 증명하였다(Yun et al. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97(7) pp.2961-70(2013)). 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산에 있어 수율이 매우 낮고 쉽게 과분해되는 문제점이 있는 화학적 처리방법(Jol et al. *Anal Biochem*. 268, pp.213-222(1999), Kim et al. *Bull Korean Soc*. 31(2) pp.511-514(2010))을 대신 할 마일드한 화학적 전처리와 효소적 당화과정을 통한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 생성과정 역시 보고한바 있다(대한민국 공개특허 제2013-0085017호).

[0005] 화학적 전처리 이후 처리되는 엑소 타입(exo-type)의 아가레이즈인 Aga50D 효소에 의해 주된 반응산물인 네오아가로바이오스와 아가로트리오스(D-갈락토오스-베타-1,4 결합-3,6-안하이드로-L-갈락토오스-알파-1,3 결합-D-갈락토오스)로 분해된다. 이후 네오아가로바이오스는 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소인 ScNABH(대한민국 공개특허 제2010-0108241호)에 의해 최종적으로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스로 가수분해된다. 이 과정에서 전처리는 Aga50D 효소의 반응성을 향상시키는 데 있어 필수적이나 현재 사용되고 있는 약산을 이용한 마일드한 화학전 전처리 방법은 이후 효소반응을 위해 중화 또는 동결건조 등의 공정을 거쳐야 하며 이 과정에서 다량 중화염이 발생하고 그 처리비용 또한 상당하다. 또한 화학적 전처리를 선행하게 될 경우 주로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스 사이의 알파-1,3결합이 분해되게 되어 엑소-타입의 베타-아가레이즈를 처리하였을 때 아가로트리오스가 잔존하게 되어 최종적으로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스로 분해되지 못하고 잔존하게 되는 점도 당당의 생산 수율을 감소시키는 원인이 되었다. 아울러, 현재까지 3,6-안하

이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 생산에는 아가로스를 초기 기질로 하는데, 아가로스는 홍조류로부터 수차례의 분리정제공정을 거쳐 생산되기 때문에 그 가격이 비싸다는 단점이 있었다.

[0006] 따라서, 전체 공정을 간소화하면서, 전체 공정 비용을 줄이고, 단당류의 생산 수율을 개선할 수 있는 공정 기술 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2013-0085017호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2010-0108241호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 이성목 외, J. Korean Ind. Eng. Chem. vol. 20(3), pp.290-295 (2009.06.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 생산 공정을 단축하고, 생산 단가를 감축하기 위해 기질로 한천을 사용하고, 전처리 용매와 효소적 가수분해에 사용하는 가수분해효소를 적절히 채택하여 단당류인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 pH 6 - 9의 완충용액으로 한천을 전처리하는 단계; 및 상기의 전처리 물에 대해 아가레이즈, 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈(agarolytic β -galactosidase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 가수분해 반응시키는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 초기 기질로 아가로스 대신에 한천을 사용하고, 전처리 용매로 완충용액을 사용하며, 효소적 가수분해에 사용되는 효소로 아가레이즈, 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 적용하여 단당류인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 효과적으로 개선하면서, 전처리물의 중화공정에서 생산되는 중화염을 대폭 감소시키며, 초기 기질로 저가의 한천을 사용함으로써 생산 단가와 생산 공정을 단축하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 한천을 기질로 하여 전처리물 및 효소별 반응물에 대한 TLC 사진도를 나타낸 것으로, Std는 standard로 AHG(3,6-안하이드로-L-갈락토오스), DP2(네오아가로바이오스), Gal (갈락토오스), 그리고 DP3 (아가로트리오스)을 사용하였고, 라인 1은 전처리한 한천, 라인 2는 전처리한 한천에 대한 아가레이즈(Aga50D) 반응물, 라인 3은 아가레이즈 반응물에 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈(ABG)를 처리한 반응물, 라인 4는 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈 반응물에 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소(NABH)를 처리한 반응물, 및 라인 5는 아가

레이즈 반응물에 ABG 없이 NABH를 처리한 반응물을 각각 나타낸다.

도 2는 HPLC 분석을 통해서 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈(ABG)를 사용하였을 때 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 수율 향상을 정량적으로 측정한 결과이다.

도 3은 HPLC 분석을 통해서 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈(ABG)를 사용하였을 때 D-갈락토오스의 생산수율 향상을 정량적으로 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0014] 본 명세서에서 수치범위를 기재함에 있어서, "-"란 표현은 각 수치범위의 임계치를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예컨대, pH 6 - 9는 pH 6과 pH 9를 포함하는 수치범위를 의미한다.

[0015] 본 발명은 pH 6 - 9의 완충용액으로 한천을 전처리하는 단계; 및 상기의 전처리물에 대해 아가레이즈, 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈(agarolytic β -galactosidase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 가수분해 반응시키는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법은 초기 기질로 아가로스 대비 저가의 한천(agar)을 사용하고, 전처리 용매로 완충용액을 사용하여 전처리한 후, 상기 전처리물에 대해 엑소 타입(exo-type)의 아가레이즈인 Aga50D 효소, 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈(agarolytic β -galactosidase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 반응시켜 아가로스 산분해산물로부터 단당류를 생산하는 정도로 우수한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스 생산 수율을 얻을 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법을 단계별로 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0018] 제1단계는 완충용액으로 한천을 전처리하는 과정이다.

[0019] 상기 완충용액은 한천의 효소적 가수분해 공정의 최적 요건을 맞추기 위한 것으로, 한천은 전처리 용매로 물을 사용하여 전처리 즉 열처리할 경우 젤링 효과로 인해 효소적 가수분해가 어렵다. 이러한 이유로, 완충용액을 한천에 처리하여 이러한 젤링 효과가 나타나지 않도록 하는 것으로, 구체적으로는, pH 6 - 9, 더 구체적으로는 pH 7 - 8의 중성의 Tris-HCl, 소듐 아세테이트(sodium acetate), 소듐 시트레이트(sodium citrate), 소듐 포스페이트(sodium phosphate), glycine-NaOH 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0020] 상기 완충용액 내 한천의 농도는 0.1 - 5%가 되게 하는 것이 좋다. 예컨대, 완충용액이 20 mL일 경우, 한천 0.02 - 1g을 부가할 수 있다. 상기 범위일 경우, 한천으로부터 효과적으로 아가로올리고당을 생산할 수 있다.

[0021] 상기 완충용액에 의한 전처리 조건은 한천에서 효과적으로 아가로올리고당을 생산하기 위해 100 - 200℃의 온도에서 1분 - 1시간 동안 실시할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법은 전처리를 거친 한천에 대해 중화과정을 추가로 실시할 수 있다.

[0023] 상기 중화과정은 효소적 가수분해의 최적 조건을 맞추기 위한 것으로 전처리물의 pH를 중성의 상태, 즉, pH 6 - 8로 적정하는 것이다. 적정 용매로, NaOH, 암모늄 하이드록사이드(ammonium hydroxide), 염산 (HCl) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법에 있어서, 제2단계는 상기 전처리물에 대해 효소적 가수분해를 수행하여 단당류를 생산하는 과정이다.

[0025] 효소적 가수분해는 상기의 한천 전처리물에 대해 아가레이즈, 아가로라이틱 베타-갈락토시데이즈(agarolytic β -galactosidase) 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 반응시키는 것을 특징으로 한다.

[0026] 상기 전처리 과정을 통해 한천은 아가로올리고당으로 분해되고, 상기 엑소 타입의 아가레이즈에 의해 이당체인 네오아가로바이오스와 아가로트리오스(D-갈락토오스-베타-1,4 결합-3,6-안하이드로-L-갈락토오스-알파-1,3 결합-D-갈락토오스)로 분해되며, 네오아가로바이오스는 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소에 의해 최종적으로

3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스로 가수분해 된다. 이때, 아가로트리오스의 비환원 말단에서 갈락토오스 모이어티에만 작용하는 아가로라이틱 베타-갈락토시다제를 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소 처리 전에 아가레이즈 반응물과 반응시키면 갈락토오스가 효과적으로 방출될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 아가레이즈, 아가로라이틱 베타-갈락토시다제 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 처리함으로써 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 생산 수율을 개선하게 되는 것이다.

- [0027] 상기 가수분해 반응은 20 - 40℃의 온도 범위에서 0 - 200 rpm 조건으로 30분 - 7일 동안 실시할 수 있다.
- [0028] 상기 효소들에 대해 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0029] 우선, 아가로올리고당을 분해하여 이당체인 네오아가로바이오스와 아가로트리오스를 생산하는 아가레이즈는 아가로스의 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 사이의 β -1,4-글리코사이드 결합을 절단하는 효소(이하, 'Aga50D'라 함)를 사용할 수 있다.
- [0030] 상기 아가레이즈는 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열 및 상기 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 아가레이즈는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0032] 상기 아가레이즈는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩티드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO: 2에 기재된 서열일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 다음으로, 아가로올리고당에서 갈락토오스를 방출하는데 작용하는 아가로라이틱 베타-갈락토시다제(agarolytic β -galactosidase)는 SEQ ID NO: 3에 기재된 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로올리고당 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 3에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다(이하, 'VejABG'라 함).
- [0034] 상기 아가로라이틱 베타-갈락토시다제는 아가로트리오스 같은 아가로올리고당의 비환원 말단에서 갈락토오스 모이어티에만 작용할 수 있으며, 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3 균주에서 유래한 것일 수 있다.
- [0035] 상기 아가로라이틱 베타-갈락토시다제는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩티드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO: 4에 기재된 서열일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 마지막으로, 상기 효소 반응을 통해 생산된 네오아가로바이오스를 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해할 수 있는 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 SEQ ID NO: 5에 기재된 아미노산 서열 뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 네오아가로바이오스 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 서열번호 3에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다(이하, 'scNABH'라 함).
- [0037] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0038] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩티드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO: 6에 기재된 서열일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명에서 폴리펩티드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시에 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램

램, FASTA(Pearson 등 1988 Proc. Natl Acad. Sci USA 85:2444-2448), 및 BLAST (BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) 에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

- [0040] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다. 본원에서는 아미노산 잔기에 대하여 통상의 1문자 또는 3문자 코드가 사용된다.
- [0041] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적(비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.
- [0042] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다.
- [0043] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션 (transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입 (transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈 (예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.
- [0044] 상기 아가레이즈는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [0045] 상기 아가로라이틱 베타-갈락토시다제는 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3 균주의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3 균주 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [0046] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [0047] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 킬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다.
- [0048] 상기 아가레이즈, 아가로라이틱 베타-갈락토시다제 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해의 가수분해 반응 조건은 각각 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 25 내지 35℃의 온도 범위에서 10시간 내지 24시간 동안 실시할 수 있다.
- [0049] 상기의 효소적 가수분해 반응을 수행한 후, Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad, Richmond, CA) 및 HPLC(Agilent 1100, Agilent, Waldbronn, Germany)를 순차적으로 실시하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 D-갈락토오스를 정량할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법은 완충용액을 전처리 용매로 사용하여 한천을 전처리할 경우 아가로스를 초기 기질로 사용하였을 때와 유사한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스의 생산 수율을 얻을 수 있을 뿐만 아니라 중화에 사용된 적정용매(예를 들어, NaOH)의 함량이 100배 정도 적게 사용되므로 대량생산시스템에 적합한 효과가 있다.
- [0051] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의

내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] <실시예 1> 재조합 효소 생산

[0053] *E. coli* BL21(DE3)을 재조합 균주의 호스트로, pET-21a를 벡터로 사용하여 Aga50D (EMBL id : ADB81904), NABH (EMBL id : ADB81917), 그리고 ABG (EMBL id : CP003241) 효소에 대해 재조합 단백질을 생산하였다. 50 μ g/mL의 암피실린이 첨가된 고체배지에 도말하여 형질전환에 의해 획득한 콜로니를 다시 50 μ g/mL의 암피실린이 함유된 LB(Luria broth)에 접종 후 37 $^{\circ}$ C, 220rpm의 조건으로 12시간 동안 종배양(seed culture) 하였다(20mL $\times$ 2). 그 이후 1L씩의 LB 브로스가 담긴 3L-삼각플라스크 2개에 접종하여 같은 조건에서 3시간(OD=0.8) 진탕배양하고 1시간 동안 얼음에서 식힌 후 0.1mM의 IPTG를 첨가하여 16 $^{\circ}$ C, 120rpm 조건으로 12시간 동안 발현을 유도하였다. 배양액은 원심분리(6000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15분)하여 균체를 회수하였고, 회수한 균체는 20mM 트리스 완충액(Tris-HCl, 1M NaCl pH8)에 현탁하여 초음파 파쇄기로 파쇄한 후 그 현탁액을 원심분리(16000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 60분)하여 상등액을 HisTrap HP column과 HisTrap Q FF column(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 효소들을 분리 정제한 후 8% SDS-PAGE에서 확인하였다.

[0054] <실시예 2> 완충용액을 이용한 한천의 전처리

[0055] 20mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충용액을 이용한 한천의 전처리와 3% 아세트산을 이용한 아가로스 전처리 후 당화공정을 비교하기 위해 두 종류의 전처리를 수행하였다. 20mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액 20mL에 1g(5%) 한천을 혼합하여 170 $^{\circ}$ C에서 5, 10, 15, 그리고 20분 간, 3% 아세트산 20mL에 1.4g(7%) 아가르스를 혼합하여 130 $^{\circ}$ C에서 30분 간 마이크로웨이브를 이용하여 가수분해하였다. 이후 1M NaOH를 이용하여 pH 7로 중화하였으며, 한천과 아가르스의 최종 농도는 증류수를 이용하여 4.5%로 맞춰주었다.

[0056] 표 1은 전처리 조건과 초기 기질 별로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 최종 생산수율, HMF 생성량, 중화용매의 사용량을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

표 1

[0057]

전처리							효소적 가수분해	
방법	기질	기질농도 (%)	온도($^{\circ}$ C)	시간(분)	중화제(1M NaOH, mL)	HMF 수율 ^a (%)	갈락토오스 수율 ^a (%)	AHG 수율 ^a (%)
완충용액 전처리 ^b	한천	5	170	5	0.0 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.2	19.3 $\pm$ 1.1	20.0 $\pm$ 0.7
				10	0.1 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.2	44.8 $\pm$ 3.5	44.9 $\pm$ 1.7
				15	0.3 $\pm$ 0.0	3.9 $\pm$ 0.1	26.4 $\pm$ 0.5	39.1 $\pm$ 0.1
				20	0.4 $\pm$ 0.0	8.4 $\pm$ 0.8	10.2 $\pm$ 2.4	41.3 $\pm$ 1.2
산 처리 ^c	아가로스	7	130	30	10.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	47.0 $\pm$ 0.1	54.5 $\pm$ 0.9
a: 생성된 HMF, 갈락토오스 및 AHG는 HPLC에 의해 검출되고, 초기 기질로부터 단당류의 최대량에 근거하여 평균 $\pm$ 표준편차로 표현됨 b: 완충용액으로 20mM Tris-HCl 용액(pH7.5)이 사용됨 c: 3% 아세트산이 산 전처리에 사용됨								

[0058] 표 1에 나타난 바와 같이, 아세트산을 이용한 아가르스의 전처리(130 $^{\circ}$ C, 30분)에 비해 20mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충용액을 이용한 한천의 전처리(170 $^{\circ}$ C, 10분)에서 6배 높은 HMF 생산량을 보였으나 중화에 사용된 1M NaOH 양이 100배 적게 사용되어 대량생산체제에 더욱 적합한 것으로 나타났다. 아울러, 이 조건에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 생산 수율도 유사했다.

[0059] <실시예 3> 완충용액으로 전처리한 전처리물에 대한 효소적 당화공정

[0060] 실시예 1에서 생산된 각 효소들을 Aga50D(19.0 U), ABG(4.6 U), 그리고 NABH(14.5 U) 순으로 실시예 2의 전처

리물 5 mL에 반응시켰다. 각 효소들을 30℃에서 12시간씩 반응시켰으며, 반응 이후 끓는 물에서 5분간 불활성화시켰다. 공정상에서의 ABG의 효과를 확인하기 위해 ABG를 제외한 Aga50D와 NABH 두 효소만은 앞에서 말한 조건과 동일한 조건에서 반응시켰다.

[0061] 최종 반응산물인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스는 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad, Richmond, CA)을 사용하여 HPLC(Agilent 1100, Agilent, Waldbronn, Germany)로 정량하였다. 이동상은 0.01M 트리플로아세트산을 포함한 40%(v/v) 아세토나이트릴(CH_3CN) 수용액을 사용하였으며, 온도는 65℃에서 유속 0.5mL/min으로 분석하였다.

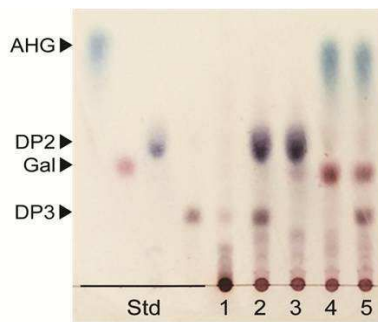
[0062] Aga50D 효소의 unit은 30℃, 20mM Tris-HCl 완충용액(pH 7) 조건에서 1분 동안 아가로스로부터 생성되는 아가로바이오스의 양으로 정의하였다.

[0063] ABG와 NABH효소의 unit은 30℃, 20mM Tris-HCl 완충용액(pH 7) 조건에서 1분 동안 각각 아가로트로오스와 네오아가로바이오스로부터 생성되는 D-갈락토오스의 양으로 정의하였다.

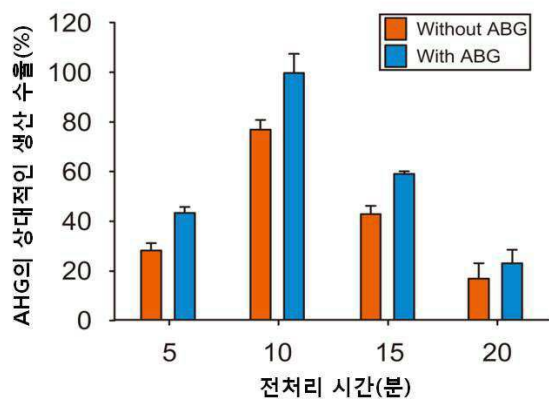
[0064] 도 1에 나타난 바와 같이, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스 모두 10분 동안 전처리한 후 ABG를 처리하였을 때 그 생산 수율이 가장 높게 나타났다. 또한, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 ABG 사용 시 1.3배 상승하였고 D-갈락토오스는 1.8배 상승하였다(도 2 및 3 참조).

도면

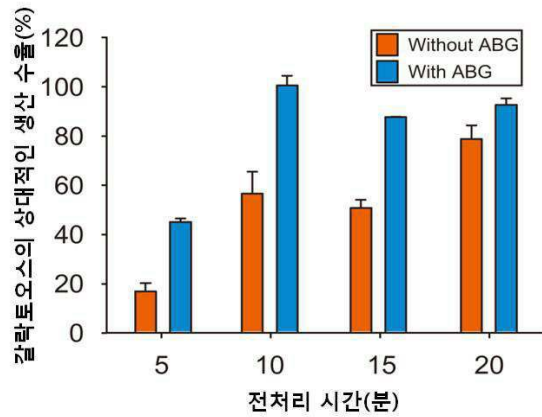
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
 <120> Method for improving production yield of monomeric sugars using pretreatment of agar by buffer solution
 <130> P14U13C0771
 <160> 6
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 747
 <212> PRT
 <213> Saccharophagus degradans 2-40
 <400> 1

Met Leu Phe Asp Phe Glu Asn Asp Gln Val Pro Ser Asn Ile His Phe

1 5 10 15

Leu Asn Ala Arg Ala Ser Ile Glu Thr Tyr Thr Gly Ile Asn Gly Glu

20 25 30

Pro Ser Lys Gly Leu Lys Leu Ala Met Gln Ser Lys Gln His Ser Tyr

35 40 45

Thr Gly Leu Ala Ile Val Pro Glu Gln Pro Trp Asp Trp Ser Glu Phe

50 55 60

Thr Ser Ala Ser Leu Tyr Phe Asp Ile Val Ser Val Gly Asp His Ser

65 70 75 80

Thr Gln Phe Tyr Leu Asp Val Thr Asp Gln Asn Gly Ala Val Phe Thr

	85	90	95
Arg Ser Ile Asp Ile Pro Val Gly Lys Met Gln Ser Tyr Tyr Ala Lys			
	100	105	110
Leu Ser Gly His Asp Leu Glu Val Pro Asp Ser Gly Asp Val Asn Asp			
	115	120	125
Leu Asn Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ser Asn Pro Pro Thr Trp Thr Ser			
	130	135	140
Asp Asp Arg Gln Phe Val Trp Met Trp Gly Val Lys Asn Leu Asp Leu			
145	150	155	160
Ser Gly Ile Ala Lys Ile Ser Leu Ser Val Gln Ser Ala Met His Asp			
	165	170	175
Lys Thr Val Ile Ile Asp Asn Ile Arg Ile Gln Pro Asn Pro Pro Gln			
	180	185	190
Asp Glu Asn Phe Leu Val Gly Leu Val Asp Glu Phe Gly Gln Asn Ala			
	195	200	205
Lys Val Asp Tyr Lys Gly Lys Ile His Ser Leu Glu Glu Leu His Ala			
	210	215	220
Ala Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Leu Asp Gly Lys Pro Met Pro Ser			
225	230	235	240
Arg Ser Lys Phe Gly Gly Trp Leu Ala Gly Pro Lys Leu Lys Ala Thr			
	245	250	255
Gly Tyr Phe Arg Thr Glu Lys Ile Asn Gly Lys Trp Met Leu Val Asp			
	260	265	270
Pro Glu Gly Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Gly Leu Asp Ile Ile Arg Leu			
	275	280	285
Ser Asn Ser Ser Thr Met Thr Gly Tyr Asp Tyr Asp Gln Ala Thr Val			
	290	295	300
Ala Gln Arg Ser Ala Asp Asp Val Thr Pro Glu Asp Ser Lys Gly Leu			
305	310	315	320
Met Ala Val Ser Glu Lys Ser Phe Ala Thr Arg His Leu Ala Ser Pro			
	325	330	335

Thr Arg Ala Ala Met Phe Asn Trp Leu Pro Asp Tyr Asp His Pro Leu
340 345 350

Ala Asn His Tyr Asn Tyr Arg Arg Ser Ala His Ser Gly Pro Leu Lys
355 360 365

Arg Gly Glu Ala Tyr Ser Phe Tyr Ser Ala Asn Leu Glu Arg Lys Tyr
370 375 380

Gly Glu Thr Tyr Pro Gly Ser Tyr Leu Asp Lys Trp Arg Glu Val Thr
385 390 395 400

Val Asp Arg Met Leu Asn Trp Gly Phe Thr Ser Leu Gly Asn Trp Thr
405 410 415

Asp Pro Ala Tyr Tyr Asp Asn Asn Arg Ile Pro Phe Phe Ala Asn Gly
420 425 430

Trp Val Ile Gly Asp Phe Lys Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Phe Trp
435 440 445

Gly Ala Met Pro Asp Val Phe Asp Pro Glu Phe Lys Val Arg Ala Met
450 455 460

Glu Thr Ala Arg Val Val Ser Glu Glu Ile Lys Asn Ser Pro Trp Cys
465 470 475 480

Val Gly Val Phe Ile Asp Asn Glu Lys Ser Phe Gly Arg Pro Asp Ser
485 490 495

Asp Lys Ala Gln Tyr Gly Ile Pro Ile His Thr Leu Gly Arg Pro Ser
500 505 510

Glu Gly Val Pro Thr Arg Gln Ala Phe Ser Lys Leu Leu Lys Ala Lys
515 520 525

Tyr Lys Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ala Trp Gly Leu Lys Leu Ser
530 535 540

Ser Trp Ala Glu Phe Asp Leu Gly Val Asp Val Lys Ala Leu Pro Val
545 550 555 560

Thr Asp Thr Leu Arg Ala Asp Tyr Ser Met Leu Leu Ser Ala Tyr Ala
565 570 575

Asp Gln Tyr Phe Lys Val Val His Gly Ala Val Glu His Tyr Met Pro
580 585 590

Asn His Leu Tyr Leu Gly Ala Arg Phe Pro Asp Trp Gly Met Pro Met

595 600 605
 Glu Val Val Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Ala Asp Val Val Ser Tyr Asn
 610 615 620
 Ser Tyr Lys Glu Gly Leu Pro Lys Gln Lys Trp Ala Phe Leu Ala Glu
 625 630 635 640
 Leu Asp Lys Pro Ser Ile Ile Gly Glu Phe His Ile Gly Ala Met Asp
 645 650 655
 His Gly Ser Tyr His Pro Gly Leu Ile His Ala Ala Ser Gln Ala Asp
 660 665 670

Arg Gly Glu Met Tyr Lys Asp Tyr Met Gln Ser Val Ile Asp Asn Pro
 675 680 685
 Tyr Phe Val Gly Ala His Trp Phe Gln Tyr Met Asp Ser Pro Leu Thr
 690 695 700
 Gly Arg Ala Tyr Asp Gly Glu Asn Tyr Asn Val Gly Phe Val Asp Val
 705 710 715 720
 Thr Asp Thr Pro Tyr Gln Glu Met Val Asp Ala Ala Lys Glu Val Asn
 725 730 735
 Ala Lys Ile Tyr Thr Glu Arg Leu Gly Ser Lys

740 745

<210> 2

<211> 2244

<212> DNA

<213> Saccharophagus degradans 2-40

<400> 2

atgttattcg attttgaaaa cgatcaagtc ccttcaaata ttcatttttt aaatgcgcgt 60
 gcaagtatag aaacctatac cggtataaat ggcgagccga gtaaagggtt aaagttggcg 120
 atgcagtcca agcagcacag ttatactggc cttgccattg tgccagagca gccttgggat 180
 tggagcgagt ttacctctgc tagcttgtat ttcgatatag tcagtgttgg cgatcattcc 240
 acacaatfff atttagatgt taccgaccaa aatggcgccg tgtttaccg cagtattgat 300
 attccagtgg gtaaaatgca atcgctactac gccaaagttaa gcggtcacga tttagaagtg 360

cccgatagtg gagacgttaa cgatttaaac ctgcctctg gcttgcgttc taaccgcct	420
acatggacat ctgacgatag gcagtttgtt tggatgtggg gagtgaataa ttagatttg	480
tcgggcattg ctaaaatata gctaagtgtg caaagcgcaa tgcacgataa aacagttatt	540
atcgataata ttctgattca acccaacccg ccgcaagatg aaaacttcct tgcggtttg	600
gtagacgagt ttggccaaaa cgccaaagt tttatacagg gtaaaatcca tagtttagaa	660
gaattgcatg cagcgcgcga tgtggaactg gccgagcttg atggcaagcc aatgcctagt	720
cgctctaagt ttggcgggtg gttggccggc cccaagctaa aagctacagg gtactttcgc	780
acagaaaaaa ttaacggtaa atggatgcta gtagaccag aagggtaccc ttactttgct	840
acgggtttag acattattcg cctatctaata tcatctacca tgactgggta cgattacgat	900
caagctactg ttgctcagcg ctctgccgac gatgtaacac ctgaagactc aaaaggttta	960
atggcagtga gcgaaaaatc atttctacg cgccacctag catcgccaac acgagcggca	1020
atgtttaact ggttgccaga ttacgatcac cctctcgaa atcattataa ctaccgtcgc	1080
tctgcgcatt ccggcccaact gaaacgcgtt gaagcctaca gcttctacag tgccaacctt	1140
gagcgtaaat acggtgaaac ttaccccggt tcttacttgg ataagtggcg cgaagtaacg	1200
gtagacagaa tgctaaactg gggctttacc tcgctaggca actggactga ccagcatat	1260
tacgacaaca atcgcatacc gtttttcgcg aatggttggg taatagggga ttttaaaacc	1320
gtatctagcg gtgcggattt ttggggcgca atgccagatg tattcgacct agaatttaaa	1380
gtgcgcgcta tggaaacggc acgcgtggtt tcagaagaaa ttaaaatag cccttggtgc	1440
gtaggggtat ttatcgataa cgaaaaaagc ttcggtcgcc ccgattccga taaggcgcaa	1500
tacggttatt ccattcatac cctcggtcgc ccaagcgaag gtgtgcctac taggcaggcg	1560
tttagtaagc tgcttaaacg caaatacaaa actatagccg cgtaaaaca tgctggggg	1620
ttaaagctta gttcttgggc tgagtttgat ttgggcgtag atgtaaaagc gctgccggt	1680
accgatactc tgcgcgcaga ttactcaatg ttactttcgg cctatgcgga ccaatatttt	1740
aaggtggtac acggcgcggt tgaacattac atgccgaacc acttgatttt aggcgcacgc	1800
tttctgatt ggggaatgcc aatggaggta gtgaaagctg ccgcaaaata cgccgatgtg	1860
gttagctata attcctacaa agagggttg cctaagcaga agtgggcttt ttagcagag	1920
ctagataagc cgagtataat cggtagttt cacatagtg ctatggatca cggttcgtat	1980
caccccggtt taattcacgc tgcgtcgag gccgatagag gtgaaatgta caaagattat	2040
atgcaatcgg taattgataa cccctacttc gtaggcgcgc actggttcca gtatatggat	2100
tcgccattaa cgggcagagc ttatgatggt gaaaactaca atgtgggttt tgtggatgtt	2160
accgacacgc cgtaccaaga aatggtggat gcagcaaaag aagtaaatgc gaaaataac	2220

accgaaaggc taggcagcaa ataa

2244

<210> 3

<211> 806

<212> PRT

<213> Vibrio sp. EJY3

<400> 3

Met His Asn Ser Pro Arg Ser Thr Thr Leu Phe Asn Asp Asn Trp Leu

1	5	10	15
Phe	Gln	Leu	Ala
Lys	Asp	Lys	Pro
Asn	Thr	Lys	Gln
Trp	Ser	Thr	Val
20	25	30	
Thr	Leu	Pro	His
Asp	Trp	Ser	Val
Ala	Ser	Ala	Phe
Ser	Pro	Gln	Tyr
35	40	45	
Asp	Gly	Ala	Thr
Gly	Tyr	Leu	Pro
Gly	Gly	Ile	Gly
Trp	Tyr	Lys	Lys
50	55	60	
Gln	Phe	Lys	Asn
Pro	Leu	Asn	Lys
His	Tyr	Ser	Arg
Cys	Ile	Leu	Val
65	70	75	80
Phe	Asp	Gly	Ile
Tyr	Asn	Asn	Ala
Thr	Ile	Asn	Ile
Asn	Gly	Tyr	Asp
85	90	95	
Ile	His	Phe	Gln
Ala	Tyr	Gly	Tyr
Ala	Pro	Phe	Asn
Ile	Glu	Ile	Thr
100	105	110	
Asp	Tyr	Leu	Lys
Ser	Asp	Asn	Val
Ile	Thr	Ile	His
Val	Asp	Arg	Arg
115	120	125	
Arg	Tyr	Ile	Asp
Ser	Arg	Trp	Tyr
Thr	Gly	Ser	Gly
Ile	Tyr	Arg	Asp
130	135	140	
Ile	Glu	Met	Val
Leu	Thr	Lys	Asp
Val	Phe	Val	Pro
Ile	Trp	Glu	Asn
145	150	155	160
His	Ile	Lys	Ala
Ser	Val	Ser	Ser
Asn	Gln	Ile	Gly
His	Ile	His	Gln
165	170	175	
Gln	Leu	Met	Ile
Glu	Ala	Lys	Thr
Lys	Thr	His	Tyr
Leu	Thr	Ile	Val
180	185	190	
Ser	Arg	Leu	Leu
Glu	Pro	Asn	Ser
Asp	Asn	Cys	Val
Ala	Thr	Ala	Arg
195	200	205	

Thr His Arg Ser Val Asn Asn Arg Glu Val Cys Asp Leu Glu Leu Thr
 210 215 220

 Cys Asp Gln Leu Ser Leu Trp Ser Pro Asp Ser Pro Ile Leu Tyr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Thr Gln Ile Tyr Glu Asn Gly Cys Val Ile Asp Lys Val Ser
 245 250 255
 Glu Asn Ile Gly Phe Arg Ser Ile Glu Phe Ser Pro Glu Gln Gly Phe
 260 265 270
 Phe Leu Asn Gly Met Pro Thr Lys Val Arg Gly Val Cys Leu His His
 275 280 285
 Asp Gly Gly Leu Val Gly Ala Ala Val Pro Asp Glu Ile Trp Ile Arg

 290 295 300
 Arg Leu Ser Lys Leu Lys Gln Cys Gly Val Asn Ala Ile Arg Ile Ala
 305 310 315 320
 His Asn Pro Ala Ser Lys Arg Leu Leu His Leu Cys Asp Thr Met Gly
 325 330 335
 Phe Leu Val Gln Asp Glu Phe Phe Asp Glu Trp Asp Tyr Pro Lys Asp
 340 345 350
 Lys Arg Leu Asn Met Gly Asn Gln His Asp Asp Phe Phe Ser Gln Cys
 355 360 365

 Tyr Thr Glu His Phe Gln Thr Arg Ala Lys Thr Asp Leu Cys Asn Thr
 370 375 380
 Leu Lys Cys His Ile Asn His Pro Ser Ile Phe Met Trp Ser Ile Gly
 385 390 395 400
 Asn Glu Ile Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Asn Val Glu Ala Thr Gly Phe
 405 410 415
 Phe Asp Ala Ser Trp Asp Gly Asn Tyr Phe Trp Ser Leu Pro Pro Asn
 420 425 430
 Ser Pro Asp Glu Ile Lys Asp Lys Leu Lys Asn Leu Pro Gln His Thr

 435 440 445
 Tyr Asp Ile Gly Lys Thr Ala Asn Lys Leu Ala Arg Trp Val Lys Ala

450 455 460
 Ile Asp Gln Thr Arg Pro Ile Thr Ala Asn Cys Ile Leu Pro Ser Ser
 465 470 475 480
 Ser Tyr His Ser Gly Tyr Ala Asp Ala Leu Asp Val Ile Gly Phe Ser
 485 490 495
 Tyr Arg Arg Val Val Tyr Asp Tyr Gly His Glu Ile Arg Pro Asn Leu
 500 505 510

 Pro Ile Ile Gly Asn Glu Asn Leu Pro Gln Trp His Glu Trp Lys Ala
 515 520 525
 Val Leu Glu Arg Asn His Val Ser Gly Leu Phe Leu Trp Thr Gly Ile
 530 535 540
 Asn Tyr Met Gly Glu Ser His Gly Lys Trp Pro Val Arg Thr Thr Asp
 545 550 555 560
 Ser Gly Leu Leu Asp Thr Ala Gly Phe Glu Lys Pro Ser Tyr Ala Leu
 565 570 575
 Phe Lys Ser Leu Trp Thr Asp Glu Pro Tyr Val Lys Val Phe Thr Gln

 580 585 590
 Arg Ala Asp Leu Thr Gln Leu Lys Phe Asp Glu Gln Thr Phe Val Ala
 595 600 605
 Phe Glu His Asp Glu Asn Ala Trp Gln Lys Lys Leu Trp Val Trp Asp
 610 615 620
 Glu Arg Asn Ser His Trp Asn Tyr Glu Asn Glu Gln Trp Val Thr Ile
 625 630 635 640
 Glu Ala Tyr Ser Asn Cys Pro Gln Val Gln Leu Tyr Leu Asn Asp Glu
 645 650 655

 Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Glu Lys Gln Ile Asp Arg Val Phe Arg
 660 665 670
 Trp Ala Leu Pro Tyr Arg Ala Gly Lys Ile Ser Leu Val Gly Leu Lys
 675 680 685
 Asn Asp Val Glu Val Thr Arg Asp Glu Ile Val Thr Ser Gly Val Pro
 690 695 700
 Arg Lys Ile Ser Ile Val Asp Glu Thr His Glu Gly Ser Ser Ser Tyr

705 710 715 720
Arg Gln Leu Ile Val Gln Met Leu Asp Lys Asp Asn His Pro Val Ser

725 730 735
His Glu Glu Ala Leu Leu Glu Phe Arg Val Arg Gly Cys Glu Trp Ile

740 745 750
Gly Ala Asp Asn Gly Ser Ile Ser Ser Ile Asn Ala Tyr Asn Ser Pro

755 760 765
Thr Ile Ala Thr Arg His Gly Arg Val Leu Ala Val Val Lys Ser Ser

770 775 780
Gln Gly Gln Ser Gly Asp Ile Glu Ile Tyr Ser Asn Ser Gly Val Lys

785 790 795 800

Ala Ser Phe Ser Leu Leu

805

<210> 4

<211> 2421

<212> DNA

<213> Vibrio sp. EJY3

<400> 4

atgcacaatt caccgagaag taccacatta ttttaacgaca actggctttt tcagttggca 60

aaagataaac cgaataccaa acaatggctg acggttacgc ttccccacga ttggagtgtg 120

gcttcggcct tttctccaca gtatgatgga gccacgggtt acctacctgg gggaattggt 180

tggtacaaaa agcagtttaa aaatcctcta aataaacact attcgcgctg tatactcgtt 240

tttgacggga tttaacaaca tgcaaccatt aatatcaatg gctatgatat acatttccaa 300

gcgtatggtt atgcgccatt caatatagaa attactgatt acttgaaatc agacaatgta 360

attactatcc atgtcgatag acgcaggtat atcgacagta ggtggtatag aggttcaggt 420

atttaccgtg atatagaaat ggttctaact aaggatgtgt ttgttcctat ttgggaaaat 480

catataaaag cttccgttag ctcaaaccag attggccata tccaccagca actgatgatt 540

gaagcaaaaa cgaaaacgca ttacttgaca attgtaagtc gtttgctcga gcccaattcc 600

gataattgcg tagctacagc tcgaacgcat cgttcagtga acaatcgaga agtatgtgat 660

ttagaactaa cgtgtgatca actgagcctt tggagcccag attcaccaat tctttataag 720

ttggaaactc aaatctacga aaatggctgc gtcattgata aggtatctga aaacattggt 780

tttcgtagca tagagttttc gccagaacag gggtttttcc tcaatgggat gccaaactaaa	840
gtccgtgggg tctgccttca tcatgatggc ggactcgttg gcgctgccgt acctgatgaa	900
atatggatac gtcggttgtc aaagctcaaa caatgtgggtg taaatgcaat aagaatcgca	960
cacaaccag cctccaagcg tctattgcac ctctgtgaca cgatgggatt tctggtcag	1020
gatgagtttt ttgacgagtg ggattatcct aaagataaac gccttaacat gggcaaccaa	1080
cacgatgact ttttcagcca atgttacacc gagcactttc aaacccgagc aaaaaccgat	1140
ctttgtaata cggtgaaatg ccatattaac catccatcaa tattcatgtg gagtattggc	1200
aacgaaattg agtggaccta cccacgcaac gtcgaagcaa cgggcttttt tgatgcaagt	1260
tgggatggga attatttctg gagcttacca cctaactctc ccgatgaaat aaaagataaa	1320
ctcaaaaatt tgccacagca cacttatgat attgggaaaa ctgcaacaa gcttgctcgt	1380
tgggtaaaag ctatcgatca aactcgaccg attactgcca actgtatcct tccatcatcc	1440
agctaccatt caggttacgc cgacgcgctc gatgtaattg gatttagtta tcgacgtgtt	1500
gtatatgatt atgggcatga aatcagacct aacctgccga taatcggtaa tgaaaattta	1560
cctcaatggc atgaatggaa agcagtgcct gaacgcaacc atgtatccgg attgtttctt	1620
tggactggaa tcaattatat gggagaatct catggtaaat ggcctgtaag aaccactgac	1680
agcggcctgc tagacaccgc tgggtttgaa aaaccaagtt atgcgctttt taaatcgctg	1740
tggacagacg aaccttatgt caaagtatit actcaacgag cagacttaac acaactgaag	1800
tttgacgagc aaacttttgt tgcctttgaa catgatgaaa atgcttggca aaaaaatta	1860
tgggtctggg acgaaagaaa ctgcactgg aattatgaaa atgagcaatg ggtcactatc	1920
gaagcctata gcaactgtcc gcaggtacaa ctctacctca acgatgagtt ggttggaacc	1980
caacagttag aaaagcaaat cgacagagtc tttcgttggg ccttaccata tagagcagga	2040
aagatctctc tggttggttt aaagaacgac gtagaggtaa ctagagatga aattgtcacg	2100
tctggagtgc cgaggaagat ctcgattgta gatgaaaccc atgaaggttc aagctcatac	2160
cggcaactta tagtccagat gcttgataaa gacaaccatc cagtgagtca tgaagaagca	2220
ttgttagagt ttcgtgttcg cggttgtgaa tggattggag ccgataatgg cagtatatct	2280
tctatcaacg catataatag cccaacgatt gctacacgtc atggcagagt ttagcagtt	2340
gtaaaatcat cgcagggtca aagtggatgat atcgaaattt actcaaattc aggagtgaaa	2400
gcctcttttt cactacttta a	2421
<210> 5	
<211> 368	
<212> PRT	

<213> Saccharophagus degradans 2-40

<400> 5

Met Ser Asp Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Ser Lys Ala Ser Leu Arg

1 5 10 15

Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Asp Glu Lys Gly Pro Glu Trp Leu Phe Glu

20 25 30

Phe Asp Ile Thr Pro Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val

35 40 45

Ile Arg Arg Asp Pro Ser Ala Val Leu Lys Val Asp Asp Glu Tyr His

50 55 60

Val Trp Tyr Thr Lys Gly Glu Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Asp

65 70 75 80

Asn Pro Glu Asp Lys Val Phe Pro Trp Asp Lys Thr Glu Val Trp His

85 90 95

Ala Thr Ser Lys Asp Lys Ile Thr Trp Lys Glu Ile Gly Pro Ala Ile

100 105 110

Gln Arg Gly Ala Ala Gly Ala Tyr Asp Asp Arg Ala Val Phe Thr Pro

115 120 125

Glu Val Leu Arg His Asn Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val

130 135 140

Lys Ala Pro Tyr Leu Asn Arg Ser Leu Glu His Ile Ala Ile Ala Tyr

145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Phe Gly Pro Trp Thr Lys Ser Asp Ala Pro Ile Leu

165 170 175

Ser Pro Glu Asn Asp Gly Val Trp Asp Thr Asp Glu Asp Asn Arg Phe

180 185 190

Leu Val Lys Glu Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro

195 200 205

Cys Leu Met Phe Phe Asn Asn Arg Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu

210 215 220

Thr Met Gly Glu Ser Met Asn Met Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly

225 230 235 240

Val Ala Ile Ala Asp Ser Pro Leu Gly Pro Tyr Thr Lys Ser Glu Tyr
245 250 255

Asn Pro Ile Thr Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp Pro Tyr Lys

260 265 270
Gly Gly Met Ala Thr Met Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr
275 280 285

Cys Gln Trp Ala Glu Asp Gly Ile Asn Phe Asp Ile Met Ser His Ile
290 295 300

Lys Gly Ala Pro Glu Ala Val Gly Phe Phe Arg Pro Glu Ser Asp Ser
305 310 315 320

Asp Asp Pro Ile Ser Gly Ile Glu Trp Gly Leu Ser His Lys Tyr Asp
325 330 335

Ala Ser Trp Asn Trp Asn Tyr Leu Cys Phe Phe Lys Thr Arg Arg Gln
340 345 350

Val Leu Asp Ala Gly Ser Tyr Gln Gln Thr Gly Asp Ser Gly Ala Val
355 360 365

<210> 6

<211> 1107

<212> DNA

<213> Saccharophagus degradans 2-40

<400> 6

atgagcgatt caaaagtaaa taaaaaattg agtaaagcta gcctgcgagc catagagcgc 60
ggctacgatg aaaaggggcc tgaatggctg tttgagtttg atattacccc actaaaaggc 120
gacttagcct acgaagaagg cgtaattcgt cgagacccca gcgcagtatt aaaggtggac 180

gatgaatatac acgttttgta caccaagggc gaaggtgaaa cagtaggctt cggcagcgac 240
aaccgccgaag acaaagtctt cccatgggat aaaacagaag tttggcacgc cacctctaaa 300
gataagatta cttggaaaga aattggccct gccatacaac gcggcgcagc tggggcatat 360
gatgaccgtg cagtgttcac ccccgaaagtc ctgcgccata acggcaccta ctaccttgta 420
tatcaaacgg taaaagcgcc ctacttaaac cgatcgctag agcatatagc catcgcatac 480
agcgattccc cttttggccc atggacccaa tccgatgcgc caattttaag cccagaaaat 540
gacggcgttt gggatacggg cgaagacaat cgatttttag taaaagagaa aggcagtttc 600

gatagccaca aagtacacga cccctgctta atgtttttta acaatcgttt ctacctgtat	660
tacaaaggcg agactatggg cgaaagcatg aacatgggcg gcagagaaat aaaacacggt	720
gtagccattg ccgactcgcc acttggggccc tacaccaaaa gcgaatacaa ccctattacc	780
aatagtggcc atgaagttgc cgtatggccc tacaaagggtg gaatggccac catgctaacc	840
accgacgggc cagaaaaaaaa cacctgccag tgggcagaag acggcattaa ctttgacatt	900
atgtcgcata taaaaggcgc accagaagca gtaggttttt ttagaccaga aagcgatagc	960
gacgacccta taagcggcat tgaatggggg ctaagccaca agtacgacgc cagctggaac	1020
tggaactatc tatgtttttt taaaacgcgt cgacaagttt tagatgcagg tagctatcag	1080
caaacaggcg attccggagc agtataa	1107